

Применение УВЭЖХ-МС/МС для определения в моче некоторых анаболических агентов и ноотропов

***Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев, А.А. Азарян, Э.М. Гашимова**

*Кубанский государственный университет,
Российская Федерация, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149*

**Адрес для переписки: Дмитриева Екатерина Владимировна, E-mail: catherine_dmitrieva@outlook.com*

Поступила в редакцию 05 февраля 2018 г., после исправлений – 19 февраля 2018 г.

Предложена экспрессная методика определения в моче запрещенного ВАДА андарина (S-4), относящегося к классу селективных модуляторов андрогенных рецепторов, фитостероида лаксогенина и некоторых представителей класса ноотропов (унифирам (DB-232), NSI-189), являющихся когнитивными энхансерами. Для подготовки проб к анализу использовали процедуру «разбавил и вколол», оптимальное разделение аналитов достигалось применением обращенно-фазового варианта ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (УВЭЖХ-МС/МС) с применением источника высокотемпературной электро-распылительной ионизации в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов. Предел обнаружения аналитов лежит в диапазоне 0.25-5 нг/мл, предел количественного определения составляет 2.5-10 нг/мл. Оценены матричные эффекты, составляющие 104-122 %. Методика применена для анализа реальных образцов мочи после однократного перорального употребления 15 мг действующего вещества. Во всех пробах мочи спустя 12 часов после употребления были выявлены определяемые аналиты, их концентрации лежат в линейном диапазоне калибровочных кривых.

Ключевые слова: УВЭЖХ-МС/МС, CAPM, андарин, лаксогенин, ноотропы, «разбавил и вколол», допинг-контроль.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 1, pp. 28-34

DOI: 10.15826/analitika.2018.22.1.005

UHPLC-MS/MS method application for the determination of several anabolic agents and nootropics in the urine

***E.V. Dmitrieva, A.Z. Temerdashev, A.A. Azaryan, E.M. Gashimova**

Kuban State University, Stavropolskaya st., 149, Krasnodar, 350040, Russian Federation

**Corresponding author: Ekaterina V. Dmitrieva, E-mail: catherine_dmitrieva@outlook.com*

Submitted 05 February 2018, received in revised form 19 February 2018

A procedure for the determination in the urine of a prohibited by WADA doping agent Andarine (S-4), which is related to the class of the selective androgen receptor modulators (SARMs), drugs that could be potentially abused by athletes to develop physical characteristics like phytosteroid Laxogenin and several nootropic compounds (Unifiram (DB-232), NSI-189), which improve cognitive function, has been proposed. The “dilute-and-shoot” procedure was used for the sample preparation. Good resolution of peaks was achieved by the reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography / tandem mass-spectrometry with heated electrospray ionization for the detection of both positive and negative ions. The limit of detection of the analytes was between 0.25-5 ng/ml, limit of quantification – 2.5-10 ng/ml, matrix effects – 104-122%. The proposed method was applied for the analysis of real samples after single 15 mg oral administration of the analytes. All analytes were positively detected in urine samples and their concentrations were in the linear range of the calibration curves.

Key words: UHPLC-MS/MS, SARM, Andarine, Laxogenin, nootropic, “dilute-and-shoot”, doping control.

ВВЕДЕНИЕ

Злоупотребление спортсменами новыми препаратами, способными привести к улучшению достигаемых результатов, приводит к ежегодному расширению списка запрещенных веществ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА). Как правило, новые препараты или очень близки, или более эффективны по сравнению со своими известными аналогами. Так, например, селективные модуляторы андрогенных рецепторов (САРМ) проявляют анаболическое действие и обладают меньшими побочными эффектами по сравнению с традиционными стероидными гормонами [1-3], что и послужило причиной их внесения в перечень запрещенных ВАДА к употреблению веществ в 2008 году [4]. Учитывая их популярность на рынке, на сегодняшний день под видом САРМов зачастую реализуют препараты, в действительности относящиеся к другим классам. В частности, лаксогенин, декларируемый как САРМ, на самом деле является фитостероидом [5].

Вместе с тем, в последнее время происходит широкое распространение ноотропов нового поколения – препаратов, являющихся усилителями когнитивных функций. В частности, унифрам (DB-232) усиливает концентрацию внимания, усвоение и запоминание информации [6, 7], а NSI-189 обладает антидепрессантными свойствами и повышенной нейрогенной активностью [8, 9], что обуславливает их немедицинское применение и указывает на необходимость разработки методик их контроля.

В настоящее время уже известны способы определения андарина. Так, широко применяется методика ферментативного гидролиза мочи с последующей жидкость-жидкостной экстракцией для определения деконъюгированных метаболитов андарина [10, 11] методом ВЭЖХ-МС/МС. Несмотря на то, что указанная методика позволяет установить факт приема андарина спустя довольно продолжительный промежуток времени, длительность и трудоемкость данной процедуры являются лимитирующими факторами при ее использовании.

Стремление сократить длительность и сложность подготовки биопроб к анализу привело к появлению процедуры «dilute and shoot – разбавил и вколол», заключающейся в разбавлении образцов растворителем и последующим анализом методом ВЭЖХ-МС. Разбавление пробы позволяет уменьшить матричные эффекты [12], но оно также ведет и к потере чувствительности определений [13]. К тому же, отсутствие стадии гидролиза существенно затрудняет определение метаболитов, однако данная методика вполне может быть использована для скрининга соединений, способных частично выводиться из организма в неизменной форме. Однозначным преимуществом способа «разбавил и вколол» является отсутствие потерь аналита, возникающих при проведении экстракции или упаривания. Принимая во внимание постоянно

возрастающую чувствительность приборов, а также возможность одновременного определения соединений различных классов, данный способ находит все более широкое распространение [14, 15].

Ранее для андарина уже было описано успешное применение процедуры «разбавил и вколол» [14, 16], в обоих случаях проводилось детектирование $[M + H]^+$ иона, однако некоторые авторы указывают, что чувствительность возрастает при определении $[M - H]^-$ иона [17, 18].

Для лаксогенина и исследуемых ноотропов на сегодняшний день не описаны процедуры определения в биологических жидкостях.

Таким образом, целью данной работы являлась разработка экспрессной и надежной методики определения в моче человека некоторых препаратов с распространенным немедицинским применением методом УВЭЖХ-МС/МС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы

Образцы андарина ((2S)-3-(4-ацетамидофенокси)-2-гидрокси-2-метил-N-[4-нитро-3-трифторметилфенил]пропионамид), лаксогенина ((25R)-3β-гидрокси-5α-спиростан-6-он), унифрама (2-[(4-фторфенил)сульфонил]гексагидропирило[1,2-а]пирозин-6(2H)-он), NSI-189 ((4-бензилпиперазин-1-ил)-[2-(3-метилбутиламино)пиридин-3-ил]метанон) (рис. 1) и индапамида (3-(аминосульфони)-4-хлор-N-(2,3-дигидро-2-метил-1H-индол-1-ил)бензамид) были приобретены у Shanghai Soyoung Biotech. Inc. (Китай). Использовали ацетонитрил и метанол квалификации «для ВЭЖХ-МС» (Biosolve, Израиль), муравьиную кислоту (Acros Organics, 98 %) и 18.2 MΩ воду, полученную при помощи системы Milli-Q.

Головные растворы аналитов с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением навески вещества в ацетонитриле и хранили при температуре -20 °С. Рабочие растворы, полученные разбавлением головных растворов ацетонитрилом, хранили при температуре 4 °С.

При построении градуировочных кривых использовали образцы мочи, полученные от добро-

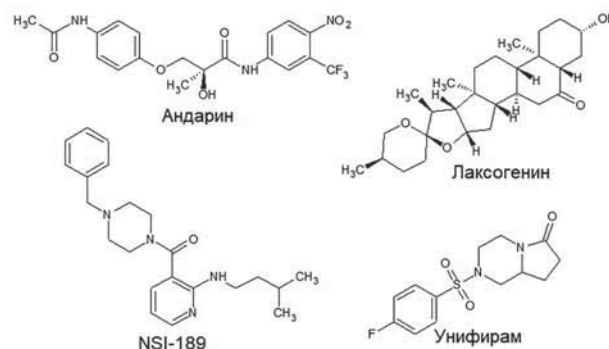


Рис. 1. Структуры определяемых аналитов
Fig. 1. Structures of target analytes

вольцев (мужчин и женщин в возрасте от 20 до 45 лет). Добровольцы заранее были проинформированы о деталях эксперимента, после чего каждым добровольцем было подписано письменное согласие на участие в исследовании. Пробы хранили при температуре -20 °С после консервации азидом натрия. Образцы, полученные от добровольцев после употребления исследуемых соединений, находились в аналогичных условиях. Установлено, что трехкратная разморозка с последующей заморозкой не приводит к существенному изменению результатов анализа.

Приборы и оборудование

Для разделения и детектирования аналитов использовали систему, состоящую из жидкостного хроматографа Ultimate 3000 с колонкой Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) и тройного квадрупольного масс-спектрометра Thermo TSQ Quantum Access Max с источником электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов.

Оптимизация методики

Подготовку проб к анализу проводили следующим образом: в пробирку Эппендорф объемом 1.5 мл вносили 100 мкл анализируемой мочи и 900 мкл смеси ацетонитрил – дистиллированная вода (70 : 30, по объему), содержащей внутренний стандарт индапамид, центрифугировали в течение 10 минут при 10000 оборотов/мин. Надосадочный слой переносили в виалу для анализа.

Для построения градуировочной кривой в холостую пробу мочи вносили исследуемые вещества для получения проб с конечной концентрацией аналитов 250, 500 и 750 пг/мл, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100 и 250 нг/мл и внутренний стандарт с фиксированной концентрацией 50 нг/мл. Каждую точку градуировочной кривой измеряли дважды, эксперимент повторяли 6 раз с использованием холостых образцов мочи, полученных от разных доброволь-

Таблица 1

Условия градиентного элюирования при скорости потока 0.45 мл/мин

Table 1

Gradient elution conditions, flow rate 0.45 mL/min

Время, мин	Элюент А, % об.	Элюент В, % об.
0	95	5
1.0	95	5
1.7	40	60
3.5	40	60
6.5	10	90
9.0	10	90
9.0	95	5
10.5	95	5

цев. Градуировочный график строили как отношение площадей пиков аналит/внутренний стандарт от концентрации аналита, коэффициенты корреляции составили 0.995-0.999.

Разделение аналитов проводили в режиме градиентного элюирования, в качестве подвижной фазы использовали 0.1 % об. раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1 % об. раствор муравьиной кислоты в метаноле (элюент В). Условия элюирования представлены в табл. 1. Скорость потока подвижной фазы составила 0.45 мл/мин при температуре термостата 40 °С.

Условия масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов приведены в табл. 2. Детектирование как протонированного, так и депротонированного молекулярного иона возможно только для андарина, для всех остальных аналитов проводилось детектирование $[M + H]^+$ -ионов. Параметры детектирования в режиме мониторинга выбранных реакций (**MRM**) показаны в табл. 3.

Применение источника электрораспылительной ионизации при анализе биологических образцов сопряжено с возможным появлением матричных эффектов из-за коэлюирующихся компонентов, в частности с изменением эффективности ионизации, поэтому их необходимо оценивать при проведении количественного анализа. Оценку матричных эффектов проводили в соответствии с рекомендациями [19, 20].

Таблица 2

Условия масс-спектрометрического детектирования с источником нагреваемой электрораспылительной ионизации

Table 2

Conditions of the mass-spectrometric detection with heated electrospray ionization

Параметр	Значение	
Режим регистрации ионов	Положительный	Отрицательный
Температура испарителя	400 °С	
Температура трансферного капилляра	320 °С	
Напряжение на источнике ионизации	4000 В	- 3000 В
Расход газа-распылителя	60 усл. ед.	
Расход вспомогательного газа	10 усл. ед.	
Давление газа-мишени в ячейке соударений	1.5 мторр	

Таблица 3

Условия детектирования аналитов в режиме мониторинга выбранных реакций

Table 3

Conditions of the mass-spectrometric detection in multiple reaction monitoring mode

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Энергия соударений, эВ	t_R , мин	Напряжение на экстрагирующей линзе, В
Андарин	442	190	23	3.25	101
		148	29		
		108	32		
	440	150	23		- 63
		261	24		
		205	31		
Лаксогенин	445	283	18	6.70	65
		191	19		
		145	36		
Унифирам	299	159	20	2.49	87
		95	33		
		98	34		
NSI-189	367	191	20	2.28	75
		135	28		
		108	41		
Индапамид	366	132	16	2.66	75
		91	34		
		117	36		

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В описанных условиях на хроматограммах отсутствуют пики с временами удерживания или MRM-переходами, аналогичные определяемым веществам и мешающие их определению. Это означает, что в подобранных условиях матрица мочи не оказывает мешающего влияния при применении процедуры «разбавил и вколол» [12].

В табл. 4 приведены найденные экспериментально аналитические характеристики разработанной методики. Как видно из данной таблицы, для андарина детектирование депротонированного иона приводит к увеличению чувствительности в два раза, однако уменьшение линейного диапазона, а также значительное влияние компонентов матрицы мочи на аналитический сигнал привели к

выбору $[M + H]^+$ -иона в качестве целевого для детектирования.

Для установления точности анализа готовили растворы контроля качества (QC) с низкой (10 нг/мл), средней (50 нг/мл) и высокой (100 нг/мл) концентрациями. Растворы контроля качества анализировали в течение одного дня по три раза, и в разные дни (табл. 5). Результат признавали удовлетворительным, если погрешность не превышала 15 % [21].

Разработанная методика была использована для анализа проб мочи спустя 12 часов после однократного перорального употребления 15 мг действующих веществ. Во всех образцах мочи были выявлены исследуемые соединения (рис. 2), при этом концентрации всех аналитов лежат в линейном диапазоне калибровочных кривых.

Таблица 4

Аналитические характеристики методики

Table 4

Analytical characteristics of the procedure

Аналит	Предел обнаружения, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Диапазон линейности, нг/мл	Матричные эффекты, %
Андарин*	0.25	2.5	2.5-75	125
Андарин**	0.5	2.5	2.5-250	104
Лаксогенин	2.5	5.0	5.0-250	111
Унифирам	5.0	7.5	7.5-250	104
NSI-189	1.0	10	10-250	122

Примечания: * – в режиме регистрации отрицательных ионов; ** – в режиме регистрации положительных ионов.

Таблица 5

Валидационные характеристики методики ($n = 18$)

Table 5

Validation characteristics of the procedure ($n = 18$)

Аналит	Введено, нг/мл	В один день			В разные дни		
		Найдено, нг/мл	Погрешность, %	Воспроизводимость, %	Найдено, нг/мл	Погрешность, %	Воспроизводимость, %
Андарин	10	10.8 ± 0.3	7.9	3.1	10.7 ± 0.9	7.2	10.2
	50	54 ± 1	7.0	2.4	54 ± 3	7.0	7.5
	100	99 ± 2	-0.7	2.7	99 ± 5	-1.1	6.9
Лаксогенин	10	10.0 ± 0.6	0.1	7.1	10 ± 1	0.3	12.4
	50	51 ± 1	2.6	3.2	52 ± 6	3.6	14.4
	100	103 ± 2	3.0	2.3	104 ± 15	3.9	13.2
Унифрам	10	10 ± 1	-2.5	10.4	9.9 ± 0.8	-1.0	14.7
	50	51 ± 2	1.4	4.0	51 ± 3	2.0	7.0
	100	105 ± 2	4.5	2.8	105 ± 6	5.1	8.2
NSI-189	10	9.4 ± 0.2	-5.7	3.0	9 ± 1	-6.1	13.9
	50	52 ± 1	4.4	2.3	52 ± 6	4.4	12.2
	100	105 ± 2	4.9	2.4	105 ± 11	5.0	11.8

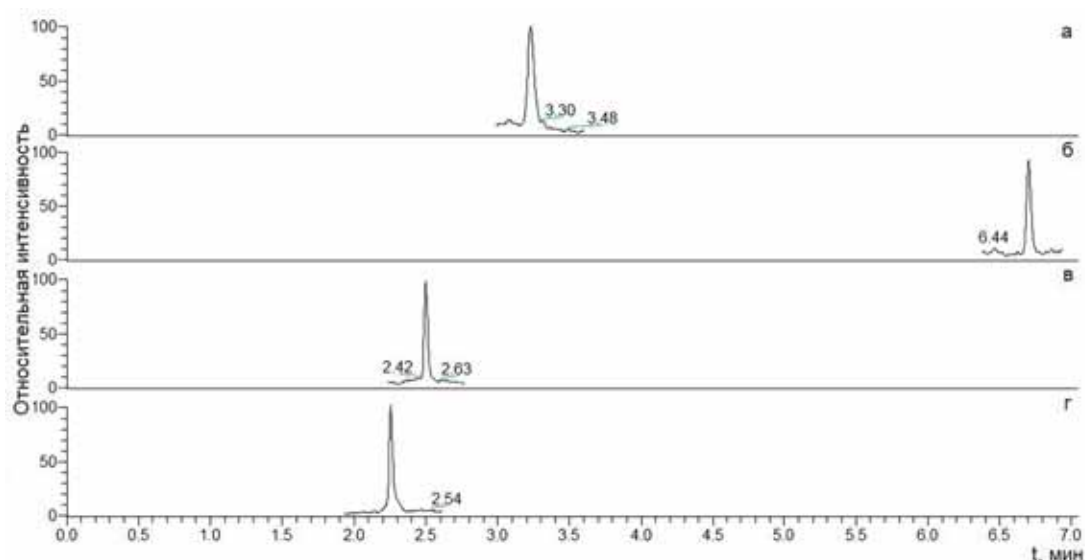


Рис. 2. Хроматограммы проб мочи после однократного перорального употребления 15 мг действующего вещества: а – андарин; б – лаксогенин; в – унифрам; г – NSI-189

Fig. 2. Chromatograms of urine samples after single oral drug administration: a – Andarine; b – Laxogenin; c – Unifram; d – NSI-189

Благодарности

Исследования проводились в рамках выполнения проекта № 4.2612.2017/ПЧ Минобрнауки РФ и финансовой поддержке РФФИ (проект 16-43-230404 p_a), с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского госуниверситета (уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008).

Acknowledgements

Current studies were carried out within the framework of the project No. 4.2612.2017 / PCh of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation and the financial support of the RFBR, project No. 16-43-

230404 p_a as well as with the use of the scientific equipment of the Central Ecological and Analytical Center of the Kuban State University, the unique identifier RFMEFI59317X0008.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen J., Kim J., Dalton J.T. Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators // Mol. Interv. 2005. V. 5. P. 173-188.
- Segal S., Narayanan R., Dalton J.T. Therapeutic potential of the SARMS: revisiting the androgen receptor for drug discovery // Expert. Opin. Investig. Drugs. 2006. V 15. P. 377-387.
- Narayanan R., Coss C.C., Dalton J.T. Development of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMS) // Mol. Cell. Endocrinol. 2017. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.013.

4. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2008 Prohibited List. International Standard. [Электронный ресурс]: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2008_EN.pdf (дата обращения 02.02.2018).
5. A Convenient Procedure for the Synthesis of 3 β -Hydroxy-6-oxo-5 α -steroids. Application to the Synthesis of Laxogenin / M.A. Iglesias-Arteaga [et al.] // J. Braz. Chem. Soc. 2005. V. 16. P. 381-385.
6. Pharmacological Characterization of DM232 (Unifiram) and DM235 (Sunifiram), New Potent Cognition Enhancers / M.N. Romanelli [et al.] // CNS Drug. Rev. 2006. V. 12. P. 39-52.
7. Structure-activity relationship studies on unifiram (DM232) and sunifiram (DM235), two novel and potent cognition enhancing drugs / S. Scapecchi [et al.] // Bioorg. Med. Chem. 2004. V. 12. P. 71-85.
8. NSI-189, a small molecule with neurogenic properties, exerts behavioral, and neurostructural benefits in stroke rats / N. Tajiri [et al.] // J. Cell. Physiol. 2017. V. 232. P. 2731-2740.
9. A Phase 1B, randomized, double blind, placebo controlled, multiple-dose escalation study of NSI-189 phosphate, a neurogenic compound, in depressed patients / M. Fava [et al.] // Mol. Psychiatry. 2016. V. 21. P. 1372-1380.
10. Starcevic B., Ahrens B.D., Butch A.W. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample // Drug Test. Anal. 2013. V. 5. P. 377-379.
11. Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes / A. Hansson [et al.] // Drug Test. Anal. 2015. V. 7. P. 673-683.
12. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology / K. Deventer [et al.] // Trends. Analyt. Chem. 2014. V. 55. P. 1-13.
13. Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods / V. Viette [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. 2011. V. 49. P. 1091-1103.
14. High-throughput screening for various classes of doping agents using a new 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach / S. Gudat [et al.] // Drug Test. Anal. 2011. V. 3. P. 836-850.
15. Doping control analysis of 46 polar drugs in horse plasma and urine using a 'dilute-and-shoot' ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach / W.H. Kwok [et al.] // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1451. P. 41-49.
16. Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection / C. Görgens [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. 2016. V. 131. P. 482-496.
17. Thevis M., Schänzer W. Mass spectrometry of selective androgen receptor modulators // J. Mass. Spectrom. 2008. V. 43. P. 865-876.
18. Favorable effects of weak acids on negative-ion electrospray ionization mass spectrometry / Z. Wu [et al.] // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 839-847.
19. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry / H. Trufelli [et al.] // Mass. Spectrom. Rev. 2011. V. 30. P. 491-509.
20. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 3019-3030.
21. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, USA. [Электронный ресурс]: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance-compliance/regulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> (дата обращения 02.02.2018).

REFERENCES

1. Chen J., Kim J., Dalton J.T. Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators. *Molecular Interventions*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 173-188. doi: 10.1124/mi.5.3.7
2. Segal S., Narayanan R., Dalton J.T. Therapeutic potential of the SARMs: revisiting the androgen receptor for drug discovery. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2006, vol. 15, no. 4, pp. 377-387. doi: 10.1517/13543784.15.4.377
3. Narayanan R., Coss C.C., Dalton J.T. Development of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017. doi: 10.1016/j.mce.2017.06.013
4. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2008 Prohibited List. International Standard. Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2008_EN.pdf (Accessed 2 February 2018).
5. Iglesias-Arteaga M.A., Simuta-Lopez E.M., Xochihua-Moreno S., Vinas-Bravo O., Smith S.M., Reyes S.M., Sandoval-Ramírez J. A Convenient Procedure for the Synthesis of 3 β -Hydroxy-6-oxo-5 α -steroids. Application to the Synthesis of Laxogenin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, vol. 16, no. 3a, pp. 381-385. doi: 10.1590/S0103-50532005000300011
6. Romanelli M.N., Galeotti N., Ghelardini C., Manetti D., Martini E., Gualtieri F. Pharmacological Characterization of DM232 (Unifiram) and DM235 (Sunifiram), New Potent Cognition Enhancers. *CNS Drug Reviews*, 2006, vol. 12, no. 1, pp. 39-52. doi: 10.1111/j.1527-3458.2006.00039.x
7. Scapecchi S., Martini E., Manetti D., Ghelardini C., Martelli C., Dei S., Galeotti N., Guandalini L., Novella Romanelli M., Teodori E. Structure-activity relationship studies on unifiram (DM232) and sunifiram (DM235), two novel and potent cognition enhancing drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, vol. 12, no. 1, pp. 71-85. doi: 10.1016/j.bmc.2003.10.025
8. Tajiri N., Quach D.M., Kaneko Y., Wu S., Lee D., Lam T., Hayama K.L., Hazel T.G., Johe K., Wu M.C., Borlongan C.V. NSI-189, a small molecule with neurogenic properties, exerts behavioral, and neurostructural benefits in stroke rats. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, vol. 232, no. 10, pp. 2731-2740. doi: 10.1002/jcp.25847
9. Fava M., Johe K., Ereshefsky L., Gertsik L.G., English B.A., Bilello J.A., Thurmond L.M., Johnstone J., Dickerson B.C., Makris N., Hoepfner B.B., Flynn M., Mischoulon D., Kinrys G., Freeman M.P. A Phase 1B, randomized, double blind, placebo controlled, multiple-dose escalation study of NSI-189 phosphate, a neurogenic compound, in depressed patients. *Molecular Psychiatry*, 2016. vol. 21, no. 10, pp. 1372-1380. doi: 10.1038/mp.2015.178
10. Starcevic B., Ahrens B.D., Butch A.W. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample. *Drug Testing Analysis*, 2013, vol. 5, no. 5, pp. 377-379. doi: 10.1002/dta.1466
11. Hansson A., Knysch H., Stanley S., Thevis M., Bondesson U., Hedeland M. Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes. *Drug Testing Analysis*, 2015, vol. 7, no. 8, pp. 673-683. doi: 10.1002/dta.1768
12. Deventer K., Pozo O.J., Verstraete A.G., Van Eenoo P. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology.

Trends in Analytical Chemistry, 2014, vol. 55, pp. 1-13. doi: 10.1016/j.trac.2013.10.012

13. Viette V., Fathi M., Rudaz S., Hochstrasser D., Veuthey J.L. Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, vol. 49, no. 7, pp. 1091-1103. doi: 10.1515/CCLM.2011.182

14. Guddat S., Solymos E., Orlovius A., Thomas A., Sigmund G., Geyer H., Thevis M., Schänzer W. High-throughput screening for various classes of doping agents using a new 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach. *Drug Testing Analysis*, 2011, vol. 3, no. 11-12, pp. 836-850. doi: 10.1002/dta.372

15. Kwok W.H., Choi T.L.S., Kwok K.Y., Chan G.H.M., Wong J.K.Y., Wan T.S.M. Doping control analysis of 46 polar drugs in horse plasma and urine using a 'dilute-and-shoot' ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach. *Journal of Chromatography A*, 2016, vol. 1451, pp. 41-49. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.002

16. Görgens C., Guddat S., Thomas A., Wachsmuth P., Orlovius A.K., Sigmund G., Thevis M., Schänzer W. Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection. *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, vol. 131, pp. 482-496. doi: 10.1016/j.jpba.2016.09.015

17. Thevis M., Schänzer W. Mass spectrometry of selective androgen receptor modulators. *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, vol. 43, no. 7, pp. 865-876. doi: 10.1002/jms.1438

18. Wu Z., Gao W., Phelps M.A., Wu D., Miller D.D., Dalton J.T. Favorable effects of weak acids on negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2004, vol. 76, no. 3, pp. 839-847. doi: 10.1021/ac0351670

19. Trufelli H., Palma P., Famiglini G., Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011, vol. 30, no. 3, pp. 491-509. doi: 10.1002/mas.20298

20. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 2003, vol. 75, no. 13, pp. 3019-3030. doi: 10.1021/ac020361s

21. FDA. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, USA. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecompliancereregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> (Accessed 2 February 2018).